

Néhány szerves sav kimutatása megoszlási kromatográfiával

VAS KÁROLY

Orsz. Magyar Mezőgazdasági Ipari Kísérleti Intézet, Budapest

Irodalmi áttekintés

A kromatográfiáról szóló irodalomban, annak nagy terjedelme ellenére, aránylag kevés adat található még a gyümölcsfélékben előforduló, valamint a mikrobás működések, erjedések során szereplő (változást szenvedő, vagy keletkező) szerves savak megoszlási kromatográfiás vizsgálatáról. Az a néhány közlemény, mely e tárgyban megjelent, főleg az elvnek oszlopban való alkalmazását tárgyalja. Bár ennek a módszernek vannak kétségtelen előnyei az ú. n. papiros-kromatográfiával szemben — így pl. az, hogy nagyobb mennyiségekkel lehet dolgozni és az identifikálási reakciókat így könnyebben el lehet végezni — mégis olyan hátrányai is vannak, melyek miatt gyakorlati szempontból kevésbé jöhet számításba. Magának a stabil fázist tartó anyagnak (pl. szilikagél) kiképzése előállítása, tisztítása rendszerint bonyolult és drága; ezenkívül nehézkes az oszlopból kifolyó, oldott anyagot tartalmazó mozgó fázisnak minél több frakcióra való felbontása és ezeknek a frakcióknak egyenkénti kémiai vizsgálata. Vannak ugyan készülékek, melyek az utóbbi két műveletet önműködően elvégzik, ezek azonban nagyon költséges, nem egyszerű berendezések.

A karbon-savak papíroson való szétválasztására a számomra hozzáférhető irodalomban eddig három, vázlatosan megírt cikket ill. utalást találtam. Az egyik (2) zsírsavak, főleg illó zsírsavak elválasztását azok metil-észtereinek kálium hidroxamátokká való átváltoztatása utáni kromatografálásával végzi, a foltok helyét pedig FeCl_3 -os permetezéssel teszi láthatóvá. A másik közlemény (3) ecetsavas butanolban ajánl három oxisav (alma-, borkő-, citromsav) papíron való elválasztására és sav-lúg indikátorral hívja elő a savfoltokat. A harmadik eljárás (1) ammóniás butanolban futtatja a zsírsavak nátriumsóit és szintén sav-lúg indikátort használ a foltok láthatóvá tételére. Ez utóbbinak nagy hátránya, legalább is a mi szempontunkból, hogy a di- és trikarbonsavak (pl. oxál-, alma-, borkő-, adipin-, citromsav) sói nem mozdulnak el és így nem foghatók meg a közölt metodikával.

Saját vizsgálatok

Kísérleteink célja az volt, hogy valamilyen megbízható és egyszerű módszert adjunk a fent említett, növényekben és erjedési termékekben található, nem illó természetes szerves savak, elsősorban di- és trikarbon-savak egymás melletti vizsgálatára.

A papír

A kísérletekhez Schleicher & Schüll Nr. 597-es, íves szűrőpapírt alkalmaztam. A papírcsíkok alakja részben széles (pl. 20—30 cm körüli), részben keskeny (pl. 1—2,5 cm. széles) szalag volt.

Az oldószer-pár

Az oldószer-pár megválasztásánál a fő szempontok a következők: stabil fázisnak legcélszerűbb a víz (így a levegő nedvessége nem befolyásolja a kapott értékeket annyira, mintha vízmentes oldószerek keverékét használnánk). A mozgó fázisnak olyannak kell lennie, hogy a savak egyike se oldódjék benne túlságosan és emellett a keverék tagjainak megoszlási hányadosai között nagy különbségek legyenek. Ebből a szempontból megfelel a célnak a butanol használata. Ez annyiból is alkalmas, hogy viszkozitása nem túl nagy, így szobahőn is elég gyorsan felszívódik és a kromatogramot aránylag gyorsan kifejleszti.

A disszociáció csökkentése

Organikus savak kromatografálásánál figyelembe kell venni azt, hogy tisztán vizes oldószerrel (butanol) nem kapunk jó kromatogramot, mert a savak a vizes fázisban erősen disszociálódnak. Ez utóbbi tény azt eredményezi, hogy a kifejlesztett képen a savak hosszan elhúzódó, diffúz foltok alakjában jelennek meg, mely utóbbiak frontjának a kezdő vonaltól számított távolsága a savkoncentrációtól függően változik és így R_F érték megállapítása lehetetlenné válik.

Organikus savak megoszlási kromatografálásánál a legnagyobb gonddal kell ügyelni ezért a disszociáció visszaszorítására. Ez legegyszerűbben úgy történhet, hogy valamely illósavat viszünk a rendszerbe a kromatogram kifejlesztésekor és így a kis töménységű savak disszociációját nagy hidrogénion-koncentrációval visszaszorítjuk. (A kifejlesztés után az illósavat hőkezeléssel elűzhetjük.) Mint már említettem, az irodalomban eddig leírt módszerek közül az egyik erre épít és ecetsavat alkalmaz a butanolos-vizes oldószer-párhoz hozzátét gyanánt.

Kipróbálva ezt a módszert, a következő összeállítású oldószer-párt használtam: 4 tf. n-butanol + 1 tf. jégecet + 5 tf. deszt. víz.

4%-os savoldatok 2—5 μ l-jét felvíve platinakaccsal a papírra és általában vékony csíkokkal dolgozva 28° C-on (5—8 óráig front 21—50 cm; fel-ill. leszálló technika), néhány savra vonatkozólag a következő R_F -értékeket kaptam.

1. táblázat

	R_F (%)		
	Átlag (1)	Szélső értékek (2)	A meghatározások száma (3)
Tejsav (4)	72,2	71—73	6
Oxálsav (5)	15,3	12—22	7
Almasav (6)	44,6	43—49	12
Borkósav (7)	24,3	21—27	9
Citromsav (8)	34,4	27—38	5

Az általános tapasztalat az volt, hogy, bár a savfoltok súlypontjai elég távol estek egymástól, jó szeparálást mégsem lehetett elérni, mert a foltok nagyon elnyúltak a haladás irányában, igen erősen elliptikusak voltak. Ennek következménye az, hogy az egymáshoz aránylag közel eső R_F -értékű savak foltjai érintkeznek, egymásba folynak.

Tekintettel arra, hogy ilyen mérvű elkülönítés céljainknak nem felelt meg, más eszközökhöz kellett folyamodni a disszociáció visszaszorítására. Miután a vizsgálandó savak között egyesek erősen disszociálódnak, az ecetsav ($pK = 4,75$) helyett valamely ennél erősebb illó savat kellett alkalmazni az oldószerpárban.

2. táblázat

	Disszociációs állandók (1)			
	C°-on	pK_1	pK_2	pK_3
Tejsav (2)	25	3,85	—	—
Oxálsav (3)	25	1,23	4,19	—
Borostyánkősav (4)	25	4,19	5,48	—
Almasav (5)	25	3,42	5,13	—
Borkősav (6)	25	2,98	4,34	—
Citromsav (7)	18	3,08	4,77	6,40

A következő vegyületek jöhetnek itt számításba :

Hangyasav : $pK = 3,75$ ($20^\circ C$)

Kénnessav : $pK_1 = 1,81$ ($18^\circ C$) — $pK_2 = 6,99$ ($18^\circ C$)

Sósav

A sósavas eljárás ezidő szerint nem ad kielégítő eredményt. Bár a disszociációt ez a sav szorította leginkább vissza és a keletkezett savfoltok szabályosak, kereksek voltak, a sósav mégsem használható minden további nélkül, elsősorban, mert tönkremegy szárítás közben a szűrőpapír és sav-lúg indikátor használata itt lehetetlen. 5 tf. butanol + 1 tf. konc. HCl + 2 tf. deszt. víz keverékével dolgozva, borkősavra a következő értéket kaptam (felszálló, $28^\circ C$, 5 óra, front : 19,4 cm.) :

$$R_F (\%) = 48,4$$

A párhuzamosan elvégzett ecetsavas (4 tf. butanol + 1 tf. jégcet + 5 tf. deszt. víz) keverékkel kapott R_F -érték 20,0 volt. Tehát a sósavas közegben a haladási sebesség az ecetsavassal szemben nő.

Miután több kísérlet a sósavnak a papírról való maradéktalan eltávolítására eredménytelenül végződött, hangyasavat vittem az oldószer-keverékbe, előzőleg meggyőződve arról, hogy a hangyasav a szűrőpapírról aránylag enyhe hőkezeléssel, rövid idő alatt teljesen eltávolítható. 4 tf. butanol + 1 tf. hangyasav + 5 tf. deszt. víz keveréke szolgált a kromatogramm kifejlesztésére. Az almasav és a borkősav jól szeparált, kerek foltok alakjában jelentkezett a kész kromatogrammon.

A hangyasav tehát jó kromatogrammmokat ad, azonban a műveletek egyszerűsítése céljából szükségesnek látszott a kénnessav kipróbálása is. A hangyasav beszerzése az itt szükséges nagy tisztaságban költséges, gyakran lehetetlen. Kénnessavoldatot sűrített kéndioxidos palackból kellő tisztaságban könnyen elő lehet

állítani bárhol, s emellett az ára is lényegesen olcsóbb, mint a megfelelő tisztaságú hangyasavé.

Előzetes próbák azt bizonyították, hogy a kénessav szűrőpapírról aránylag könnyen és maradék nélkül elúzható: 100°C -on kb. 1 óra alatt, szobahőn egy éjszakán át.

1 tf. butanol + 1 tf. telített kénessavoldat keverékével futtatva almasavat és borkósavat, jól szeparált, kerekded foltok keletkeztek a papíron.

A módszert több savra vonatkozólag kipróbálva, a következő átlag R_F -értékeket kaptam:

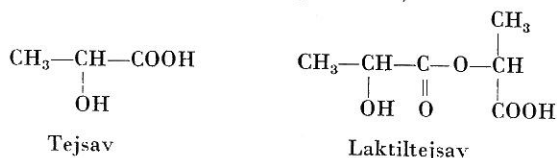
3. táblázat

	R_F (%)		
	Átlag (1)	Szélső értékek (2)	A meghatározások száma (3)
Tejsav (4)	75,8	73—81	30
Laktitejsav (5)	84,3	82—88	10
Oxálsav (6)	22,5 ?	12—25 ?	5
Borostyánkősav (7)	80,0	77—82	11
Almasav (8)	56,4	51—61	30
Borkósav (9)	32,7	26—38	30
Citromsav (10)	48,4	44—54	28

(1, 2, 5. ill. 18—30 cm széles papíreszkök (Schleicher & Schüll Nr. 597); fel-, ill. leszálló kifejlesztési technika; $20-30^{\circ}\text{C}$; futtatás: 4—12 óra; front: 20—50 cm.)

A kapott értékek tehát általában elég jó szeparálást engednek meg, kivéve az oxálsav esetét, melynél a savfolt teljesen elhúzódik, a folt frontjának a kezdővonalától mért távolsága pedig a savtöménység függvénye. Itt tehát a disszociációt még kénessavval sem sikerült visszaszorítani: az oxálsav erősebb sav, mint a kénessav ($pK_{\text{SO}_2} = 1,81$; $pK_0 = 1,23$)

A tejsav és a borostyánkősav elválasztása egymástól ezzel az oldószerpárral nehéz, mert az R_F -értékek nagyon közel esnek egymáshoz. Különösen megnehezíti a dolgot, ha kereskedelmi tejsavkészítménnyel állunk szemben, mert itt a nagyobb mennyiségű sav felvitele esetén láthatóvá válik egy a normális tejsavnál (α -oxipropionsav) gyorsabban futó folt is, mely a laktitejsavnak felel meg minden valószínűséggel (l. sók kromatográfiája):



A laktitejsav a nagyobb töménységű tejsavkészítményekben az összes savnak tekintélyes hányadát teszi ki és besűrítés közben keletkezik a tejsavból víz kilépésével.

Kétségek felmerülése esetén a vizsgálandó savkeverékkel párhuzamosan ismert savoldatokat is futtathatunk ugyanazon a papíron és ezek elmozdulásának mértékéből következtethetünk a keverék összetételére.

Kísérletet tettem a továbbiakban arra vonatkozólag, hogy az előbbi komponensekből álló oldószerkeverékek disszociációt visszaszorító hatását az illósav töménységének növelésével erősítsem. Az ecetsavas és a kénessavas butanolos oldószerkeverék felső fázisának illósavtartalmát e sav arányának növelésével fel-emeltem. A következő táblázatban láthatók a különböző illósavtartalmú oldószer-párokból tapasztalt R_F -értékek borkő-, citrom-, tej- és almasavra vonatkozólag.

4. táblázat

	Az oldószerkeverék összetétele (1)						R_F (%)			
	butanol (2)	víz (3)	SO_2 - old. (4)	ecetsav (5)	hangya- sav (6)	sav-konc. a felső fázisban (7)	tej- (8)	alma- (9)	borkő- (10)	citrom- (11)
	t é r f o g a t (12)						s a v			
Kénessavas	40	—	40	—	—	0,68 N	74,2	54	32,5	48,5
butanol (13)	30	—	120	—	—	1,34 N	75,2	54	31,0	47,0
Ecetsavas	40	50	—	10	—	1,82 N	76,5	53	38,0	49,0
butanol (14)	40	80	—	20	—	2,64 N	78,5	59	50,5	58,0
Hangyasavas	40	50	—	—	10	1,68 N	77,5	50	29,5	44,0
butanol (15)	40	80	—	—	20	2,17 N	77,0	48	27,0	41,0

(25° C.; 4—5 óra; felszálló: 4%-os savoldat; front: 18—26 cm.)

Látható, hogy az ugyanazokból az alkotórészekből álló oldószerkeverék illósavtartalmának növelése általában nem volt nagy hatással az egyes savak R_F -értékeire, kivéve talán az ecetsavas butanolt, melynél a tejsavtól eltekintve, a többi vizsgált sav R_F -értékei nagyobb illósav-töménység esetén nagyobbak.

A savfoltok egymástól való elválása azonban általában a nagyobb sav-töménységű keverékben sem volt jobb. Ez azzal magyarázható talán, hogy a normalitásnak hangyasav vagy kénessav esetén pl. a kétszeresre emelése a disszociáció visszaszorulását ezeknél a hidrogénionkoncentráció értékeknél már nem növeli lényegesen. Ecetsavnál ellenben az illósavkoncentráció növelése már határozottan csökkentette a disszociációt, tehát a folt széthúzódnását.

A diffúzió elkerülése a kromatogramm kifejlesztésekor

A savfoltok, különösen a tejsav és a borostyánkősav foltjainak szétterjedése nem kívánatos jelenség a kromatografiában. Az eredetileg 5—7 mm átmérőjű kör alakjában felvitt savoldat a kész kromatogrammon gyakran 15×30, sőt 20×40 mm-es ellipszis alakjában jelenik meg. Ezzel különösen gyenge savak esetén a savfolt észrevehetősége, színintenzitása romlik.

A foltoknak ezt a szétterjedését megkísértem csökkenteni úgy, hogy olyan mozgó fázist alkalmaztam, melyben a savak rosszabbul oldódnak, mint a butanolban. Erre a célra különféle zsíroldószerkeveréket használtam fel: benzint, benzolt, toluolt, xilolt, továbbá butanol és benzin keverékét, valamint, kontrollképen, tiszta butanolt. Mindezeket az oldószerkeveréket azonos térfogatú, telített kénessav-oldattal keverten alkalmaztam. (1 cm széles papírcsíkok; felszálló technika; 20° C.; 4 óra futtatás; front: 20—21 cm.)

A kísérlet azzal az eredménnyel járt, hogy a foltok szétterjedését nem sikerült meggátolni. Egyik zsíroldószerben sem mozdult el a papírra felvitt tej-, alma- és

borkősav-folt; csak a butanollal kevert Benzinben és a tiszta butanolban kaptam elmozdulást.

E két utóbbi oldószert összehasonlítva, azt találtam, hogy a benzinnel a butanolhoz adásával a savak R_F -értékei erősen lecsökkennek és egymástól szét-húzódnak, ami kromatografiai szempontból előny. Így pl. tejsav, almasav és borkősav esetén az R_F -értékek a két oldószerben a következőképpen alakulnak:

5. táblázat

	R_F (%)			
	tejsav (1)	laktitejsav (2)	almasav (3)	borkősav (4)
50 tf. butanol + 50 tf. telített kénessav (5)	73 (100)	85 (100)	54 (100)	35 (100)
25 tf. butanol + 25 tf. benzin + 50 tf. telített kénessav (6)	50 (68)	75,5 (89)	18,5 (34)	5,5 (16)

Vagyis míg a laktitejsav R_F -értéke a benzin-hozzáátét hatására a tiszta butanolban tapasztalhatónak 89%-ára csökken, addig tejsavnál a tiszta butanolos érték 68%-ára, almasavnál 34%-ára, borkősavnál 16%-ára esett az R_F -értéke: tehát az egyes foltok egymás közeléből széjelebb húzódtak és így szeparálódásuk tökéletesebb lett. (Újabb oldószerkeverékekre vonatkozó kísérleteinket egy későbbi közleményben fogjuk ismertetni.)

Az oldott anyag

A következőkben az oldott anyagnak, tehát a kromatografálandó savnak a kromatogramra gyakorolt hatását vizsgáltam.

A koncentráció szerepe

Először is a papírra felvitt sav-csepp töménységének, illetőleg az adott papírfelületre eső savmennyiségnek az R_F -re ill. a kényelmes észlelés lehetősége gyakorolt befolyását néztem. A savakból 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10 és 15 g/dl-es oldatokat állítottam elő és mikropipettával 2 μ l.-t vittem fel a papírra. Ez a folyadékmennyiség kb. 6 mm. átmérőjű körben oszlott el, ill. szivárgott szét, tehát kb. 1 és 10 μ g. között mozgott az 1 mm²-re felvitt savmennyiség.

6. táblázat

Sav-koncentráció: μ g/mm ² (1)	R_F (%)					
	1	2	3,5	5,5	7,5	11
Tejsav (2)	73,8	74,5	74,0	73,7	73,4	72,8
Laktitejsav (3)	—	83,3	83,3	83,9	83,4	82,8
Oxálsav (savfront) (4)	19,8	38,1	50,3	62,8	—	—
Borostyánkősav (5)	80,4	79,5	79,5	—	—	—
Almasav (6)	52,2	52,0	51,5	52,7	52,9	52,8
Borkősav (7)	26,1	26,7	28,5	29,0	28,5	29,6
Citromsav (8)	44,2	44,4	44,8	44,6	44,8	44,9

(Leszálló; 8—10,5 órás futtatás; 18° C; front: 32—37 cm.)

Az eredmények kiértékelése arra mutatott, hogy a savkoncentrációknak, ill. mennyiségnek ez a változtatása nem befolyásolja az R_F -értékeket: csak az oxálsav esetén változtatja a koncentráció a savfolt frontjának előrefutását.

A legkisebb savkoncentráció, mely még jól látható foltot ad, általában $3,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($2 \mu\text{l}$. 5%-os oldat: $100 \mu\text{g}$.), kivéve a borostyánkőssavat, melynél ez a mennyiség gyengén észlelhető csak (vízben ez a sav csak gyengén oldódik és így nehezen vihető fel nagyobb töménységben a papírra).

Szabad savak, sók, savanyú sók

Megkíséltem a továbbiakban szabad savak helyett ezek sóinak kromatografálását kénessavas butanolban, abból a megfontolásból kiindulva, hogy a kénessav felszabadítja a sókból a szabad savakat és így a sók is kromatografálhatók lesznek.

Egymás mellett futtattam kb. 7,5%-os (savra vonatkozólag!) sav-, savanyúsó- és sófoltokat kénessavas butanolban.

Az egybázisú tejsavnál a felvitt kalciumlaktátból az egész savtartalom felszabadult és a megfelelő R_F -értékű helyre előrehaladt, a kalcium, lassabban vonulva, lúgos foltot hagyott a papírnak egy sokkal kisebb R_F -értékű pontján. — A kétbázisú savaknál a savfelszabadítás semleges és savanyú sókból sohasem volt teljes. Mindig maradt egy rész, mely a kationnál is lassabban mozgott és a kezdővonalától nem messzire haladva, savfoltként jelentkezett.

Sók futtatása esetén a felszabadult savak R_F -értékei némely esetben módosultak. Így pl. kálium-nátrium-tartarát futtatásakor a savfolt a tiszta sav 32,3 R_F -ével szemben 17,5-re csökken és erősen torzult foltot adott.

7. táblázat

	R_F (%)	
	sav 1)	só 2)
Tejsav (3)	77,8	75,5
Oxálsav (savfront) (4)	32,1	nincs savfolt!
Borostyánkősav (5)	79,8	79,8
Almasav (6)	57,2	56,7
Borkősav (7)	32,3	17,5
Citromsav (8)	49,2	43,4

(Leszálló; 9 óra; 19°C ; front: 47 cm.)

Tejsavas sóknál a laktiltejsavnak megfelelő foltot nem kapjuk meg, jelöl annak, hogy az ilyen készítmények — miután bepárlásnak, ill. hőkezelésnek nincsenek alávetve — nem tartalmazznak laktiltejsavat.

Az oxálsavas sókból a kénessavas butanolos futtatás láthatólag nem szabadítja fel a savat, ami a pK-értékek összehasonlításától is valószínűnek látszik.

Az előhívó'adat

A kifejlesztett kromatogrammot a savfoltok láthatóvátétele céljából elő kell hívni. Erre olyan indikátorokat kell alkalmazni, melyeknek színátváltási köze lehetőleg alacsony pH-értékeknél van, tekintettel arra, hogy illósavas elő-

kezelés után 7 pH-nál átcsapó indikátorral mindig egységesen savasnak fogjuk tapasztalni az egész papírdarabot.

Indikátorok

A kipróbált indikátorok közül megfelelőeknek látszanak a következők: kongó-vörös (pH 3—5), brómfenolkék (pH 2,8—4,5), brómkrezolöld (pH 3,7—5,3), metiloranzs (pH 3—4,3), és a metilvörös (pH 4,2—6,3). A tropeolin 00 (pH 1,3—3,2) és a timolkék (pH 1,2—3,7) nem bizonyultak megfelelőeknek.

A legtöbb előhívás kb. 5 pH-ra beállított, 96 %os alkoholban oldott 0,04% töménységű brómfenolkékkel történt.

Eredménytelenek maradtak azok a próbálkozások, melyek azt célozták, hogy ne sav-lúg alapon kelljen megfogni a kérdést, hanem valamely más, az összes szerves savra jellegzetes csoport-szín-reakcióval lehessen előhívni a kifejlesztett kromatogramot; ennek különösen sósavas butanol használata esetén volna jelentősége. A kutatás ebben az irányban tovább folyik.

Kísérlet történt:

- a) Ferrikloriddal való permetezéssel és ammóniás befúvatással,
- b) Ninhidrines, fenolos butanollal végzett hevítéssel,
- c) Az *Uffelmann*-reagenssel (fenol + ferriklorid),
- d) A *Tocher*-reakcióval (kobaltacetát + NaOH),
- e) A *Braun*-féle kimutatási móddal (kobalthexaminklorid + NaOH),
- f) $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ -os reagenssel, de egyik eljárás sem volt alkalmas szűrő-papíron való kivitelezésre.

A legjobb kimutatási módnak tehát ezidő szerint a sav-lúg indikátorok alkalmazása látszik.

Reményekre jogosít azonban *Pacsu*, *Mora* és *Kent* (4) eljárása (lúgos KMnO_4 -os reagens), mellyel nemcsak az ezen szerzők által említett szénhidrátok, hanem természetesen a minket érdeklő savak is kimutathatók papíron.

A foltok szétterülésének megakadályozása

Tekintettel arra, hogy vízben vagy alkoholban jól oldódó savak foltjai a permetezés közben szétterülhetnek, szükségesnek mutatkozott olyan előhívóoldat használata, melyben a savak nem oldódnak. Ilyen oldószernek az irodalmi adatok szerint pl. a tejsavnál a petroléter és a kloroform lenne alkalmas. Az indikátorként használt brómfenolkék komolyabb mértékben csak a kloroformban oldódik. Az ilyen oldattal végzett permetezés azt eredményezte, hogy a savfoltok valamivel gyengébben terültek szét a papíron.

A hőfok szerepe

A hőfok hatását az R_F értékére technikai okokból nem tudtam ezideig még megvizsgálni. Lehetséges, hogy a közölt eredményekben mutatkozó szórást részben erre lehet visszavezetni.

Az eredmények kiértékelése

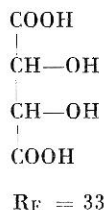
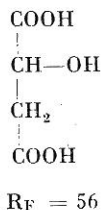
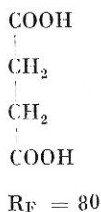
Néhány organikus sav papírkromatográfiás szétválasztását kíséreltem meg. A disszociáció visszaszorítására ecet- és hangyasavon kívül a sósavat és a kénessavat is kipróbáltam. Az utóbbi két anorganikus illósav használata sokatigérőnek látszik, részben erős disszociáltságuk miatt, részben pedig azért, mert butanollal nem észtereződnek, ami nagyobb töménységű ecet- és különösen hangyasav esetén aránylag hamar bekövetkezik, megváltoztatva az oldószerek eredeti összetételét.

A sósav alkalmasnak látszik a kromatogramm kifejlesztésére, a szerves savak foltjainak előhívása azonban ilyen esetben — a sósav utolsó nyomainak a papírról való nehéz eltávolíthatósága miatt — sav-lúg indikátorokkal nem történhet. Itt egy megfelelő, papíron végrehajtható csoport-szín-reakcióra lenne szükség. — Lúgos KMnO_4 (4) alkalmas indikátornak ígérkezik.

Sav-lúg-indikátorok használata esetén a legcélszerűbbnek a kénessavas eljárás mutatkozik. Ez jól visszaszorítja (a nagyon erősen disszociált oxálsav kivételével) a szerves savak disszociációját, jól elkülönült, kerekded, foltokat ad, aránylag könnyen eltávolítható a papírról, a szükséges tisztaságban való beszerzése pedig egyszerű és olcsó.

Az organikus oldószerfázisba célszerű a butanol mellé olyan oldószert is belevinni, mely a szerves savakat nem, vagy alig oldja (pl. benzint). Ezáltal egyes savak, melyeknek R_F -értéke tiszta butanolban nagyon közel esik egymáshoz (pl. az alma- és citromsav), jól szeparálhatók.

A kénessavas butanolban végzett mérések jól mutatják, hogy az R_F -értékek a két oldószerfázis közti megoszlási hányadosokkal egyértelműen változnak: minél több a savmolekulában a poláris csoport, annál jobb a vizes fázisban való oldhatósága, tehát az R_F annál kisebb. Az egymástól csak az alkoholos hidroxilok számában különböző borostyánkő-, alma- és borkósav esetén az R_F -értékek a következőképpen alakulnak:



Gyenge karbon-savak sói is kromatografálhatók akkor, ha a kénessav fel tudja szabadítani belőlük a szabad savat. Az R_F -értékek ilyenkor több savnál módosulnak. A sav felszabadítása gyakran nem kvantitatív.

A kénessavas eljárásnak kvantitatív módszerré való kidolgozása folyamatban van.

Érkezett: 1951. augusztus 7-én.

A Mezőgazdasági Ipari Kutató Intézetek 1950. október 19-én tartott kollokviumának anyaga.

Irodalom

1. Brown: Nature, 166. 66. 1950.
2. Fink & Fink: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70. 654. 1949.
3. Lugg & Overell: Nature, 160. 87. 1947.
4. Pacsu, Mora & Kent: Science, 110. 446. 1949.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ПРИ ПОМОЩИ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

Кароль Ваш.

Венгерский Государственный Сельскохозяйственный Промышленно Исследовательский
Институт, Будапешт

Выводы

Нами проверено отделение нескольких органических кислот при помощи бумажной хроматографии. Для подавления диссоциации применялись нами кроме уксусной и муравьиной кислот также соляная и сернистая кислоты. Применение последних двух летучих неорганических кислот кажется перспективным стачи вследствие высокой степени их диссоциации, а главным образом потому, что с бутанолом не образуют эфиров, что в случае более концентрированной уксусной, и особенно муравьиной кислот происходит относительно быстро, изменяя тем самым оригинальный состав смеси растворителей.

Соляная кислота кажется подходящей для создания хроматограмм, однако проявление пятен органических кислот в этом случае — вследствие трудности удаления последних следов соляной кислоты из бумаги — не может проводиться при помощи индикаторов кислота-щелочь. Здесь оказывается необходимым применение соответствующей групповой цветной реакции, производимой на бумаге. Щелочный раствор $KMnO_4$ (4) кажется подходящим индикатором.

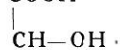
В случае применения индикаторов кислота-щелочь, самым целесообразным кажется сернистокислый метод. Сернистая кислота хорошо подавляет диссоциацию органических кислот (за исключением весьма сильно диссоциирующей щавелевой кислоты), образует отчетливые, круглые пятна, относительно легко удаляема из бумаги, а покупка ее в соответствующем очищенном виде проста и дешева.

В органическую фазу растворителя целесообразно вводить к бутанолу растворителя нерастворяющего, или почти нерастворяющего органические кислоты (например, бензин). При помощи такого растворителя отдельные органические кислоты, величины R_F которых в чистом бутаноле является весьма близкой (например яблочная и лимонная кислоты), хорошо отделямы.

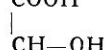
Измерения, произведенные в сернистокислом бутаноле хорошо показывают, что величины R_F изменяются соответственно коэффициентам распределения между двумя фазами растворителя: чем больше в молекуле кислоты болярных групп, тем лучше ее растворимость в водной фазе, следовательно тем меньше величина R_F . В случае янтарной, яблочной и винскокаменной кислот, отличающихся только числом алкогольных гидроксильных групп, величины R_F получаются следующими:



$$R_F = 80$$



$$R_F = 56$$



$$R_F = 33.$$

Соли слабых карбоновых кислот также хроматографируемы в случае, если под влиянием сернистой кислоты высвобождается в них свободная кислота. Величины R_F в этом случае у некоторых кислот изменяются. Освобождение кислоты часто не является количественным.

Разработка сернистокислотного метода в количественный метод производится в настоящее время.

ОБЪЯСНЕНИЯ К ТАБЛИЦАМ

Таблица 1.

1. Среднее
2. Крайние величины
3. Число определений

4. Молочная кислота
5. Щавелевая кислота
6. Яблочная кислота
7. Винскокаменная кислота
8. Лимонная кислота

Таблица 2.

1. Постоянная диссоциации
2. Молочная кислота
3. Щавелевая кислота
4. Янтарная кислота
5. Яблочная кислота
6. Винокаменная кислота
7. Лимонная кислота

Таблица 3.

1. Среднее
2. Крайние величины
3. Число определений
4. Молочная кислота
5. Лактиломочная кислота
6. Щавелевая кислота
7. Янтарная кислота
8. Яблочная кислота
9. Винокаменная кислота
10. Лимонная кислота

Таблица 4.

1. Состав смеси растворителей
2. Бутанол
3. Вода
4. Раствор SO_2
5. Уксусная кислота
6. Муравьиная кислота
7. Концентрация кислоты в верхней фазе
8. Молочная кислота
9. Яблочная кислота
10. Винокаменная кислота
11. Лимонная кислота
12. Объем
13. Сернистокислый бутанол

14. Уксуснокислый бутанол
15. Муравьинокислый бутанол

Таблица 5.

1. Молочная кислота
2. Лактиломочная кислота
3. Яблочная кислота
4. Янтарная кислота
5. 50 объемных частей бутанола + 50 объемных частей насыщенной сернистой кислоты
6. 25 объемных частей бутанола + 25 объемных частей бензина + 50 объемных частей насыщенной сернистой кислоты

Таблица 6.

1. Концентрация кислоты в мг/мм²
2. Молочная кислота
3. Лактиломочная кислота
4. Щавелевая кислота (кислотный фронт)
5. Янтарная кислота
6. Яблочная кислота
7. Винокаменная кислота
8. Лимонная кислота

Таблица 7.

1. Кислота
2. Соль
3. Молочная кислота
4. Щавелевая кислота (кислотный фронт)
5. Янтарная кислота
6. Яблочная кислота
7. Винокаменная кислота
8. Лимонная кислота

Nachweis einiger organischen Säuren mit Hilfe der Verteilungschromatographie

K. VAS

Ungarische Versuchsanstalt für das landwirtschaftliche Gewerbe, Budapest

Zusammenfassung

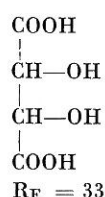
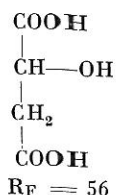
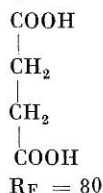
Es wurde die Trennung einiger organischen Säuren mit Hilfe der Papierchromatographie versucht. Zwecks Verhinderung der Dissoziation wurden neben Essig- und Ameisensäure, versuchsweise auch Salzsäure und schweflige Säure angewendet. Die beiden letzterwähnten flüchtigen, anorganischen Säuren versprechen viel, teils infolge ihres hohen Dissoziationsgrades, teils weil sie keine Ester mit Butanol bilden, was bei Essig- und besonders bei Ameisensäure, im Falle höherer Konzentrationen, verhältnismässig rasch eintritt, und die ursprüngliche Zusammensetzung des Lösungsmittels verändert.

Salzsäure erscheint geeignet zur Ausbildung des Chromatogrammes, doch ist die Entwicklung der Flecke von organischen Säuren in diesem Falle mittels Säure-Laugenindikatoren nicht durchführbar, weil die letzten Spuren der Salzsäure nur schwer vom Papier entfernt werden können. Hier wäre eine entsprechende, auf Papier ausführbare Gruppen-Farbenreaktion notwendig. Alkalische Permanganatlösung (4) könnte den entsprechenden Indikator abgeben.

Bei Verwendung von Säure-Laugenindikatoren ist das Verfahren mit schwefliger Säure das zweckmässigste. Abgesehen von der stark dissoziierten Oxalsäure drängt die schweflige Säure die Dissoziation der organischen Säuren weitgehend zurück, sie gibt einen sich gut von der Umgebung absondernden, rundlichen Fleck, ist verhältnismässig leicht vom Papier zu entfernen, und leicht, mit geringem Kostenaufwand, in der erforderlichen Reinheit zu beschaffen.

Es empfiehlt sich der organischen Phase des Lösungsmittels, neben Butanol noch ein anderes Lösungsmittel einzuverleiben, welches die organischen Säuren nur wenig oder garnicht löst (z. B. Benzin). Auf dieser Weise lassen sich auch solche Säuren (z. B. Äpfel- und Zitronensäure) voneinander trennen, deren R_F -Wert in reinem Butanol nur wenig voneinander abweicht.

Messungen in schwefligsaurem Butanol zeigen, dass die R_F -Werte gleichsinnig mit dem Verteilungskoeffizient zwischen den beiden Lösungsmittelphasen sich verändern: je mehr polare Gruppen in dem Säuremolekül vorhanden sind, umso besser ist die Löslichkeit in der wässrigen Phase, also umso geringer der R_F -Wert. Im Falle von Bernstein-, Äpfel- und Weinsäure, die sich nur in der Zahl alkoholischer Hydroxylgruppen voneinander unterscheiden, gestalten sich die R_F -Werte wie folgt:



Die Salze von schwachen Karbonsäuren lassen sich ebenfalls chromatographieren, falls schweflige Säure die betreffende Säure in Freiheit zu setzen vermag. Bei manchen Säuren verändern sich die R_F -Werte in diesem Falle. Das Freiwerden der Säure ist oftmals nicht quantitativ.

Versuche, das schweflige saure Verfahren in ein quantitatives zu verwandeln, werden fortgesetzt.

Tabelle 1.

R_F -Werte in essigsäurem Butanol

(Lösungsmittel: 4 Vol. Butanol + 1 Vol. Eisessig + 5 Vol. Wasser; Papier: Schleicher & Schuell, Nr. 597; 4%-ige Säurelösungen; 2—5 μ l; 28° C; Lösungsmittelfront: 21—50 cm. ascendente bzw. descendente Entwicklung; 5—8 Stunden.)

- | | |
|---------------------------|-------------------|
| (1) Mittelwert | (5) Oxalsäure |
| (2) Minimum und Maximum | (6) Äpfelsäure |
| (3) Zahl der Bestimmungen | (7) Weinsäure |
| (4) Milchsäure | (8) Zitronensäure |

Tabelle 2.

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| (1) Dissoziationskonstante | (5) Äpfelsäure |
| (2) Milchsäure | (6) Weinsäure |
| (3) Oxalsäure | (7) Zitronensäure |
| (4) Bernsteinsäure | |

Tabelle 3.

R_F -Werte in schwefligsaurem Butanol

(Lösungsmittel: 1 Vol. Butanol + 1 Vol. gesättigter SO_2 -Lösung; Papier: Schleicher & Schuell, Nr. 597; 1—2,5 bzw. 18—30 cm. breite Streifen; 20—30° C; Lösungsmittelfront: 20—25 cm; ascendente bzw. descendente Entwicklung; 4—12 Stunden).

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| (1) Mittelwert | (6) Oxalsäure |
| (2) Minimum und Maximum | (7) Bernsteinsäure |
| (3) Zahl der Bestimmungen | (8) Äpfelsäure |
| (4) Milchsäure | (9) Weinsäure |
| (5) Laktylmilchsäure | (10) Zitronensäure |

Tabelle 4.

Einfluss des Gehalts des Lösungsmittels an flüchtiger Säure auf die R_F -Werte (25° C; Front: 18—26 cm; ascendente Entwicklung; 4—5 Stunden.)

- | | |
|--|--|
| (1) Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches | (5) Essigsäure |
| (2) Butanol | (6) Ameisensäure |
| (3) Wasser | (7) Säurekonzentration in der oberen Phase |
| (4) SO_2 -Lösung | (8) Milchsäure |

- | | |
|---------------------|-------------------------------|
| (9) Äpfelsäure | (13) Butanol mit SO_2 |
| (10) Weinsäure | (14) Butanol mit Essigsäure |
| (11) Zitronensäure | (15) Butanol mit Ameisensäure |
| (12) Volumeinheiten | |

Tabelle 5.

Einfluss des Benzin-Zusatzes auf die R_F -Werte in schwefligsaurem Butanol
(20° C; Front: 20—21 cm; ascendente Entwicklung; 4 Stunden.)

- | | |
|----------------------|--|
| (1) Milchsäure | (5) 50 Vol.-Teile Butanol + 50 Vol.-Teile gesättigter SO_2 -Lösung |
| (2) Laktylmilchsäure | |
| (3) Äpfelsäure | (6) 25 Vol.-Teile Butanol + 25 Vol.-Teile gesättigter SO_2 -Lösung |
| (4) Weinsäure | |

Tabelle 6.

Einfluss der Konzentration der Säure-Flecken auf die R_F -Werte in schwefligsaurem Butanol
(18° C; Front 32—37 cm; descendente Entwicklung; 8—10 Stunden).

- | | |
|------------------------------------|--------------------|
| (1) Konzentration ($\mu g/mm^2$) | (5) Bernsteinsäure |
| (2) Milchsäure | (6) Äpfelsäure |
| (3) Laktylmilchsäure | (7) Weinsäure |
| (4) Oxalsäure (Front des Flecks) | (8) Zitronensäure |

Tabelle 7.

Chromatographieren von Säuren und ihrer Salze in schwefligsaurem Butanol
(19° C; 47 cm; descendente Entwicklung; 9 Stunden.)

- | | |
|----------------------------------|--------------------|
| (1) freie Säure | (5) Bernsteinsäure |
| (2) Salz | (6) Äpfelsäure |
| (3) Milchsäure | (7) Weinsäure |
| (4) Oxalsäure (Front des Flecks) | (8) Zitronensäure |

Detection of Certain Organic Acids by Partition Chromatography.

K. VAS

Hungarian Institute for Research in Agricultural Industry, Budapest

Summary

The separation of certain organic acids by paper chromatography has been attempted. In addition to acetic and formic acids hydrochloric and sulfurous acids were also tested as agents reducing dissociation of solutes. The use of the latter volatile organic compounds seems promising partly owing to their strong dissociation partly because they do not form esters with butanol. This latter process occurs relatively quickly when higher concentrations of acetic and, especially, of formic acid are applied, resulting in a change of the original composition of the solvent phases.

Hydrochloric acid seems suitable for developing chromatograms. The spots of organic acids, however, should in this case be developed with reagents other than acid-base indicators since it is difficult to remove the last traces of hydrochloric acid from the filter paper. A group colour test appropriately performable on filter paper is needed. Treatment with alkaline potassium permanganate solutions (4) seems promising.

The sulphurous acid method proved most practical when acid-base indicators were used. The advantages of its application are the following: a) dissociation of the organic acids is considerably reduced (with exception of the strongly dissociated oxalic acid); b) well rounded and separated spots are obtained; c) the developing agent is easily removable from the filter paper; and d) sulfurous acid of required purity can be obtained without difficulty.

The introduction into the organic phase of another solvent — in which organic acids dissolve only sparingly (if at all), e. g. gasoline — seems advisable. This makes the separation of certain acids the R_F values of which in pure butanol are very close to each other (e. g. malic and citric acids) much easier.

Measurements performed in butanol containing sulfurous acid showed that the higher the number of polar groups in the acid molecule the higher the solubility in the aqueous phase and thus the lower the R_F . The following R_F values were observed with succinic, malic and tartaric acids which differ only in the number of alcoholic hydroxyl groups contained:

COOH	COOH	COOH
CH ₂	CH—OH	CH—OH
CH ₂	CH ₂	CH—OH
COOH	COOH	COOH
$R_F = 80$	$R_F = 56$	$R_F = 33$

The salts of weak carboxylic acids can also be chromatographed provided sulfurous acid is able to liberate the acid from them. In such cases the R_F values of several acids change. The liberation of acids from their salts does not always proceed quantitatively.